

氏 名	中 馬 統 一 郎
生 年 月 日	
本 籍	鹿 児 島 県
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 553 号
学 位 授 与 の 日 付	2003 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	課 程 博 士 (学 位 規 則 第 4 条 第 1 項)
学 位 授 与 の 題 目	In vivo voltammetry 法による縫線核からのセロトニン介在性脳内鎮痛機構の解析
論文審査委員(主査)	辻 彰 (薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一 (医学部附属病院・教授) 横井 毅 (医学系研究科・教授) 山田 清文 (薬学部・教授) 鈴木 永雄 (研究科・教授)

学 位 論 文 要 旨

Abstract

This study was conducted to examine the effects of cutaneous heat nociceptive stimulation as well as the intrathecal administration of morphine on the activity of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus (NRM) and dorsal raphe nucleus (DRN) of anaesthetized rats. Differential normal pulse voltammetric technique with carbon fiber electrode was applied to evaluate the sequential kinetics of oxidation currents at +280 mV (5-hydroxyindole signal). The 5-hydroxyindole signal in the NRM was significantly decreased by noxious heat stimulation. In the DRN, distinct oxidation currents of catechol and 5-hydroxyindole were detected at +120 mV and +280 mV, respectively. The catechol signal was significantly increased by cutaneous noxious heat stimulation at 52°C. The 5-hydroxyindole signal was decreased by heat stimuli. Intrathecal administration of low dose of morphine potentiated the noxious-induced increase in the catechol signal in the DRN and decreased in the 5-hydroxyindole signals in the NRM and the DRN. morphine at high dose significantly attenuated all of these modifications on signals. The effects of morphine at low and high doses were antagonized by prior treatment with naloxone. These results indicate that noxious heat stimulation decreases the release of 5-HT in the NRM and DRN and increases the release of NE in the DRN. Intrathecally administered morphine modulated the release of NE and 5-HT induced by noxious heat stimulation in the NRM and DRN via the opioid receptor-mediated mechanism. There may be a complicate pain regulatory system in raphe-spinal neuronal network.

中脳および延髄のセロトニン(5-HT)神経起始細胞体を構成する縫線核は脳内鎮痛機構に

重要な役割をもつことが知られている。大縫線核の 5-HT 含有線維は脊髄に下降性に投射して脊髄後角に至り、一次知覚神経からの侵害情報伝達を制御していることが明らかになっている。すなわち、大縫線核は脊髄視床細胞に抑制的に作用し、また、モルヒネは大縫線核の神経細胞を興奮させ、下降性 5-HT 神経系の活性化により抗侵害作用を発現することが明らかになっている。背側縫線核の 5-HT 神経系は体温、睡眠、心血管機能、運動神経など多くの生理機能に関与している。背側縫線核も脳内鎮痛機構に重要な役割をもち、痛覚調節機能に関与していることが明らかになっている。背側縫線核は高密度の 5-HT 細胞体より構成され、青斑核からノルエピネフリン(NE)神経の投射を受けている。背側縫線核の 5-HT 遊離は α_1 および α_2 受容体によって調節されており、背側縫線核に投射する NE 神経が 5-HT 神経系の活動を制御していることが示唆されている。このように大縫線核および背側縫線核の 5-HT 神経系は下降性鎮痛機構を構成する中枢神経系として、さらにモルヒネの鎮痛作用に関与する神経細胞体として重要な役割をもつことが示唆されているものの、これらの部位におけるインドールアミンやカテコールアミンの侵害刺激による影響に関してはほとんど明らかになっていない。本研究では differential normal pulse voltammetry (DNPV)法で大縫線核および背側縫線核の 5-HT および NE 遊離について検討した。本法は、神経終末より遊離されたモノアミンを極めて限局した脳組織において経時的に測定することが可能である。本研究では DNPV 法を用いて、大縫線核および背側縫線核の 5-HT および NE 神経系におよぼす熱侵害刺激の影響を明らかにし、さらにモルヒネの作用について神経化学的解析を行い、以下の結果を得た。

1. 大縫線核の 5-hydroxyindole に対する侵害刺激およびモルヒネの影響

大縫線核より得られた +280~+300 mV の酸化電位に記録された酸化電流の変化は細胞外の 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)によることを 5-HT 前駆物質、5-HT 合成阻害剤およびキサンチンオキシダーゼ阻害剤を用いた薬理学的手法で示した。この酸化電流は 52℃の熱侵害刺激によって $21.9 \pm 5.2\%$ の有意な減少反応を示した。また、圧侵害刺激によっても同様に減少反応を示した。この 5-HIAA の酸化電流の減少は、熱侵害刺激の温度(45℃、52℃)に依存し、非侵害刺激(37℃)では変化しなかった。熱侵害刺激による大縫線核の 5-hydroxyindole 酸化電流の減少反応は低用量モルヒネ(0.5 mg/kg)腹腔内投与により有意に増強された。一方、モルヒネ 2.0 mg/kg および 5.0 mg/kg の投与では熱侵害刺激による減少反応は有意に減弱された。モルヒネ単独投与ではいずれの投与量でも 5-hydroxyindole の酸化電流に変化は認めなかった。塩酸ナロキソンはこれらのモルヒネの作用に対して拮抗作用を示した。

2. 大縫線核の 5-HT 遊離におよぼす熱侵害刺激およびモルヒネの影響

Nafion コーティングを施した微小炭素繊維電極を用いることにより、大縫線核において 5-HT の酸化電流を測定することが可能となった。大縫線核における 5-HT の酸化電流に対する熱侵害刺激の影響を検討し、大縫線核の 5-HT の酸化電流は熱侵害刺激によって $28.5 \pm 5.7\%$ の明らかな減少反応を示した。酸化電流の減少反応は刺激温度に依存し、非侵害刺激(37℃の温水)では酸化電流に有意な変化は認められなかった。

モルヒネを脊髄クモ膜下腔内に投与したところ、5.0 μg の投与では熱侵害刺激による大縫線核の 5-HT 酸化電流の減少反応は有意に増強された。モルヒネ 2.5 μg の脊髄クモ膜下腔内投与でも同様の反応が認められた。一方、高用量のモルヒネ投与(10.0 μg および 15.0 μg)では熱侵害刺激による 5-HT 酸化電流の減少反応は減弱された。モルヒネのこれらの作用に対する塩酸ナロキソンの影響を検討したところ、低用量のモルヒネによる増強作用および高用量のモルヒネによる減弱作用は拮抗された。

3. 熱侵害刺激による大縫線核のセロトニン代謝におよぼすオピオイドペプチドの影響

侵害情報の入力部位である脊髄後角におけるオピオイドペプチドの作用を検討するために methionine enkephalin (Met-Enk)、leucine enkephalin (Leu-Enk) 及び dynorphin A₁₋₁₃ (Dyn) の脊髄クモ膜下腔内投与が大縫線核の 5-HT 代謝に及ぼす影響を検討した。Met-Enk (90 nmol) および Dyn (1.5 nmol) の脊髄クモ膜内投与は、熱侵害刺激による大縫線核の 5-HIAA の酸化電流の減少反応を増強した。一方、Met-Enk (180, 360 nmol)、Leu-Enk (600, 1200 nmol)、Dyn (3.0, 6.0, 10.0 nmol) の高用量投与では、酸化電流の減少反応を減弱させた。

4. 背側縫線核のカテコールアミンおよびセロトニン神経系に対する侵害刺激および脊髄クモ膜下腔内モルヒネ投与の影響

背側縫線核における NE および 5-HIAA の酸化電流に対する熱侵害刺激の影響を検討した。52°C の熱侵害刺激により NE の酸化電流は $22.9 \pm 4.2\%$ の有意な増大反応を示した。一方、5-HIAA の酸化電流は、 $39.8 \pm 4.3\%$ の有意な減少反応を示した。非侵害刺激である 37°C の温水では、これらの酸化電流に有意な影響を与えなかった。

次にモルヒネの脊髄クモ膜下腔内投与の影響を検討した。モルヒネ 2.5 μg の投与では 52°C の熱侵害刺激による NE の酸化電流の増大反応および 5-HIAA の酸化電流に対する減少反応とともに増強させた。すなわち、侵害刺激による NE の増大反応は、 $36.1 \pm 4.5\%$ に、5-HIAA の減少反応は、 $66.1 \pm 8.5\%$ といずれも有意に増強された。一方、モルヒネ 10 μg では NE および 5-HIAA の熱侵害刺激による増大反応と減少反応をそれぞれ $8.4 \pm 3.5\%$ および $14.4 \pm 3.5\%$ にいずれも有意に減弱させた。塩酸ナロキソン投与により、モルヒネ 2.5 μg および 10 μg の脊髄クモ膜下腔内投与による効果は拮抗された。

考察

本研究では、5-HT 起始細胞体であり脳内鎮痛機構に密接に関与する大縫線核の 5-HT 代謝におよぼす侵害刺激の影響、ならびに代表的な鎮痛薬であるモルヒネの作用について *in vivo* voltammetry 法で検討した。大縫線核の 5-HT およびその代謝物である 5-HIAA の酸化電流は侵害刺激により刺激強度に依存した有意な減少反応を示した。大縫線核の 5-HT 神経系には自己受容体を介して 5-HT 遊離を調節する介在性のフィードバック機構の存在が示唆されており、侵害刺激による 5-hydroxyindoles の酸化電流の減少は、大縫線核において 5-HT 遊離調節を介した侵害情報の自己調節機構の重要性を示唆した。

モルヒネの全身投与および脊髄クモ膜下腔内投与は、5-hydroxyindoles の酸化電流の減少反応に対して投与量により異なる影響を及ぼした。すなわち、モルヒネの低用量投与は、侵害刺激による 5-hydroxyindoles の酸化電流の減少反応を増強させ、高用量では、減弱さ

せた。さらにオピオイドペプチド(Met-Enk、Leu-Enk および Dyn)の脊髄クモ膜下腔内投与も大縫線核の 5-HT 代謝に同様の影響を与えた。高用量のモルヒネまたはオピオイドペプチドの脊髄への投与は侵害情報の大縫線核への入力を脊髄において直接的に抑制した結果、侵害刺激による大縫線核の 5-HT 遊離への影響を減弱させたものと考えられた。一方、低用量のモルヒネは熱侵害刺激による 5-HT 酸化電流の減少反応を増強した。末梢からの C 線維由来の侵害刺激に応答する脊髄後角の神経活動は、低用量のモルヒネの脊髄クモ膜下腔内投与で亢進されることが報告されている。さらに、低用量のモルヒネは脊髄後角においてナロキソン感受性の興奮性神経ペプチドの遊離促進作用をもつことが示唆されている。熱侵害刺激による大縫線核の 5-HT 遊離の減少は脊髄クモ膜下腔内への低用量のモルヒネで増強されるという本研究の結果は、脊髄レベルにおける侵害情報伝達の複雑な調節機構の存在を示唆するものである。さらにこれらのモルヒネの作用はナロキソンで拮抗されたことから、これらのモルヒネの作用に内因性のオピオイド受容体の密接な関与が明らかとなった。

背側縫線核では DNPV 法で細胞外の NE および 5-HIAA の酸化電流を測定可能であることが明らかとなり、本研究では背側縫線核の NE および 5-HT 神経系への熱侵害刺激の影響を検討した。熱侵害刺激は NE の酸化電流を増大し、5-HIAA の酸化電流を減少させることが明らかになった。背側縫線核ではアドレナリン α_1 、 α_2A 受容体が 5-HT 遊離を調節していることが報告されている。本研究の結果は、熱侵害刺激が NE 神経を活性化し、NE の遊離をもたらし、その結果、5-HT 神経に存在する α 受容体を介して 5-HT の遊離を抑制している可能性を示唆した。NE 遊離の減少により 5-HT 合成が亢進し、NE は 5-HT 遊離を抑制するという報告からも、この神経制御は支持される。

熱侵害刺激による背側縫線核の NE および 5-HIAA の酸化電流に対するモルヒネ脊髄クモ膜下腔内投与の影響を検討し、モルヒネ 10 μ g は侵害刺激による NE の増大反応および 5-HIAA の減少反応をそれぞれ有意に減弱させることを示した。一方、モルヒネ 2.5 μ g は熱侵害刺激による NE の増大反応および 5-HIAA の減少反応をそれぞれ有意に増強させた。この結果は、大縫線核の 5-HT 酸化電流へのモルヒネの作用と同様であった。モルヒネは脊髄からの侵害情報伝達に影響をもたらすことにより、背側縫線核の NE および 5-HT 神経系の侵害刺激応答に対しても、影響を与えることが明らかとなった。さらに、背側縫線核に由来する脳内鎮痛機構には 5-HT 神経系および NE 神経系の関与が示唆された。

総括

1. 微小炭素繊維電極を用いた DNPV 法を用いて、大縫線核の 5-HT 遊離および背側縫線核の NE および 5-HT 遊離に及ぼす熱侵害刺激の影響およびモルヒネの作用について、神経化学的研究を行った。
2. 熱侵害刺激は大縫線核および背側縫線核の 5-HT 神経系を抑制し、背側縫線核の NE 神経系を活性化させた。
3. モルヒネの全身投与および脊髄クモ膜下腔内投与は侵害刺激による大縫線核および背側縫線核のこれらの反応に対して低用量で増強作用を示し、高用量で減弱作用を示すことが明らかとなった。

4. モルヒネはオピオイド受容体を介して、縫線核の 5-HT 神経系および NE 神経系の侵害受容反応に影響を与えることが示唆された。
5. 中脳および延髄の縫線核は 5-HT 神経系および NE 神経系を介して、侵害情報の調節に関与していることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

セロトニン (5-HT) 含有神経をもつ延髄の大縫線核の中脳中心灰白質の腹側正中にある背側縫線核は脳内鎮痛機構に重要な働きをしていることが知られている。しかし、5-HT 遊離と鎮痛機構の関係についてはほとんど解明されていない。また、モルヒネの縫線核群の 5-HT 神経に対する作用についてもほとんど研究されていない。

本研究は、脳幹部の 5-HT 起始細胞体であり、脳内鎮痛機構に深く関与する大縫線核および背側縫線核の 5-HT 神経系の役割を明らかにするために、*in vivo* voltammetry 法を用いて大縫線核および背側縫線核の 5-HT 遊離に及ぼす熱侵害刺激の影響を検討し、さらにモルヒネの鎮痛作用について神経化学的研究を行い、以下のような成果を得た。

ラット大縫線核より得られた +280 ~ 300mV の 5-hydroxyindole 酸化電流の変化は細胞外の 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) によることを示した。この酸化電流は熱および圧侵害刺激によって減少し、温度 (45℃, 52℃) に依存して減少したが、非侵害性熱刺激 (37℃) では変化しなかった。また、この熱侵害刺激による酸化電流の減少に対して、モルヒネはオピオイドペプチドと同様、低投与量で増強作用を示し、高投与量で減弱作用を示した。そして、ナロキソンはこれらオピオイドのいずれの作用に対しても拮抗作用を示したことから、モルヒネの作用はオピオイド受容体を介したものであることが示唆された。さらに、nafion コーティングした微小炭素電極を応用した voltammetry 法により、5-hydroxyindole 酸化電流は 5-HT 由来であることを明らかにした。一方、背側縫線核においては、+120mV のノルエピネフリン (NE) の酸化電流と +280 ~ +300mV の 5-hydroxyindole の酸化電流が記録され、侵害刺激によって、NE 酸化電流は増加し、5-hydroxyindole 酸化電流は減弱し、いずれの反応に対してもモルヒネは低投与量で増強作用を示し、高投与量で減弱作用を示すことを明らかにした。

このように、5-HT 含有神経をもつ延髄の大縫線核からの 5-HT 遊離が脳内鎮痛機構において重要な役割を演じていること、中脳中心灰白質の腹側正中にある背側縫線核ではセロトニン神経系に加えノルエピネフリン神経系が熱侵害情報伝達の調節に関与していることに加えて、モルヒネの鎮痛作用機序の解明につながる重要な知見を提示していることから、本論文は博士 (薬学) に値するものと判定された。